

**Physikalisch-chemische
Untersuchungen zum Intermediärstoffwechsel
von Leuchtbakterien**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von

Anton Franz Kremmeter

aus Memmingen

1961

1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Bukatsch
2. Berichterstatter: Prof. Dr. L. Brauner

Tag der mündlichen Prüfung: 26. 7. 1961

Lebenslauf

Am 6. Januar 1937 wurde ich, Anton-Franz Kremmeter, als Sohn des Kaufmanns Anton Kremmeter und seiner Ehefrau Helene geboren. Von meinem 6. bis 11. Lebensjahr besuchte ich die Volksschule in Memmingen. Im Jahre 1948 trat ich in das dortige Humanistische Gymnasium über, das ich im Sommer 1957 mit gutem Erfolg absolvierte. Unmittelbar nach meiner Reifeprüfung begann ich an der Universität München mit dem Studium der Naturwissenschaften. Seit dem Jahre 1959 arbeite ich an meinem Dissertationsthema.



Physikalisch-chemische Untersuchungen zum Intermediärstoffwechsel von Leuchtbakterien

Von

Anton-Franz Kremmeter* und Franz Bukatsch

Aus dem Botanischen Institut der Universität München

(Der Schriftleitung zugegangen am 15. Dezember 1961)

Die bisherigen Arbeiten über Leuchtbakterien galten den Problemen des Verwendungsstoffwechsels¹ sowie der Aufklärung des Lumineszenzmechanismus². Im Vordergrund des Interesses standen bei weiteren Untersuchungen die Beeinflussung des Bakterienleuchtens durch Entkopplungsgifte der oxydativen Phosphorylierung³, durch Röntgenstrahlen⁴, Hochfrequenzenergie⁵ und Druck⁶.

Vorliegende Arbeit befaßt sich mit Fragen des Intermediärstoffwechsels, angeregt durch den Befund, daß Atmung und Lichtentwicklung bei den genannten Organismen durch Malonat nicht gehemmt werden. Voraussetzung für derartige Untersuchungen ist ein möglichst einfaches, genau definiertes, synthetisches Kulturmedium. Der eine von uns hatte Glutaminsäure als gut verwertbare N-Quelle angegeben¹; da jedoch die Verwendbarkeit des Aminosäuren-Kohlenstoffgerüsts den Umsatz von C-Verbindungen zu beeinflussen vermag, suchten wir zunächst nach einfacheren N-Quellen.

Methodik

Unsere Untersuchungen erfolgten an einem von Nordseeheringen abgeimpften Stamm von *Photobacterium fischeri* (= *Achromobacter fischeri*): Wachstums-Temperaturoptimum 26°, Wachstums-pH-Optimum 7,8, Lichtemissions-Temperatur-optimum 18°.

Die Kulturen zogen wir in einem synthetischen Nährmedium¹, welches wir zu den eigentlichen Versuchen mit 0,15*m* Phosphatpuffer auf pH 7 einstellten.

* Angenommen als Dissertation der Universität München.

¹ F. Bukatsch u. K. Six, *Phyton* 5 (2), 67 [1955].

² M. J. Cormier u. J. R. Totter, *Biochim. biophysica Acta* [Amsterdam] 25, 229 [1957].

³ H. J. Rieder u. F. Bukatsch, *Z. Naturforsch.* 11b, 608 [1956]; *Zbl. Bakteriол., Parasitenkunde, Infektionskrankh. Hyg., II. Abt.* 110, 319 [1957].

⁴ D. Harder u. O. Hug, *Strahlentherapie* 106, 245 [1958]; O. Hug u. J. Wolf, *Strahlenforschung u. Strahlenbehandlung: Vortragssammlung der 37. Tagung der Deutschen Röntgengesellschaft in München 1955*, S. 209.

⁵ H. J. Rieder u. F. Bukatsch, *Zbl. Bakteriол., Parasitenkunde, Infektionskrankh. Hyg., II. Abt.* 110, 150 [1957].

⁶ F. H. Johnson in C. H. Werkman u. P. W. Wilson, *Bacterial Physiology*, S. 578, Academic Press Inc., New York 1951.

Zu Dichtemessungen verwendeten wir das Photometer „Eppendorf“ mit einem Nephelometriefilter (Durchlaßbereich 400—600 $m\mu$) bzw. das „Beckman Spectrophotometer Model B“ bei einer Wellenlänge von 650 $m\mu$. Obgleich die Empfindlichkeit für Dichtemessungen bei kürzeren Wellenlängen größer wäre, führten wir unsere Messungen im Roten durch, um das Wachstum der Bakterienkulturen über einen möglichst langen Zeitraum verfolgen zu können. Zwischen den Messungen wurden die Kulturen auf einer Schüttelmaschine (Frequenz: 75/Min.) bei 25° gehalten.

Die Atmungsmessungen führten wir in einer Warburg-Apparatur (B. Braun, Melsungen) bei 26° aus. Die Warburg-Gefäße enthielten 0,2 ml Bakteriensuspension sowie 2,8 ml gepufferte Lösung im Reaktionsraum, 0,15 ml 10proz. KOH im Einsatz und 0,2 ml 0,15*m* Lösung von der zu untersuchenden Substanz in der Birne.

Mit einem Spektralphotometer von Beckman (Beckman DU Modell G 2400) bzw. einem Photometer der Fa. Zeiss (Modell PQ II) untersuchten wir in Quarzküvetten die Reaktionskinetik der Enzymsysteme des Glyoxylsäurecyclus.

Die pH-Messung erfolgte mit einem Beckman-Glaselektroden-pH-Meter ohne Korrektur der Salzkonzentration.

Intensitätsmessung des von den Bakterien erzeugten Lichtes: Die mit 40 ml Bakteriensuspension beschickten Erlenmeyerkolben befanden sich während der Versuchszeit auf einer Schüttelmaschine (Frequenz: 75/Min.), um ständig einen gleichmäßigen O_2 -Partialdruck zu gewährleisten, was hinsichtlich der emittierten Lichtmenge von entscheidender Bedeutung ist⁷. Die Raumtemperatur betrug $18 \pm 0,5^\circ$. Zur Messung entnahmen wir mit einer sterilen Pipette jeweils 1,5 ml Suspension und brachten diese in einen Meßeinsatz, dessen Basis aus einer lichtdurchlässigen Folie bestand. Der mit Suspension gefüllte Einsatz wurde in die Metallfassung eines speziell dafür konstruierten lichtdicht verschließbaren Gehäuses gebracht, welches einem Sekundärelektronen-Vervielfacher aufgesetzt ist.

Die zum Betrieb des Sekundärelektronen-Vervielfachers (Multiplier) *M* benötigte Hochspannung von 700—1200 Volt lieferte ein stabilisiertes Netzgerät *N* (Type NSHR-S; Fa. A. Knott, München). Der Strom *J* der letzten Multiplidyndode erzeugt an einem stufenweise veränderlichen Meßwiderstand *R* (Widerstandsdekade: „HB und Grundig“ RD2) einen dem Strom *J* proportionalen Spannungsabfall $U = J \cdot R$, der mit einem hochohmigen Röhrenmillivoltmeter („Norma“, max. Empfindlichkeit $5 \cdot 10^{-10}$ A/cm) gemessen wurde. Die erforderliche Empfindlichkeitsveränderung der Meßanordnung wurde durch Variieren des Widerstandes *R* erreicht (vgl. Abb. 1).

Zunächst galt es festzustellen, ob die Lichtenergie einer dichten Suspension im Vergleich zu der einer weniger dichten durch Licht-

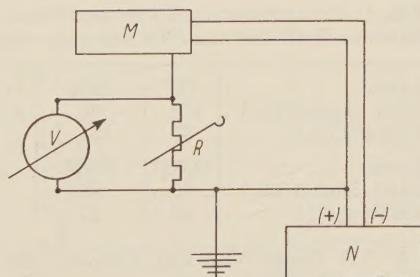
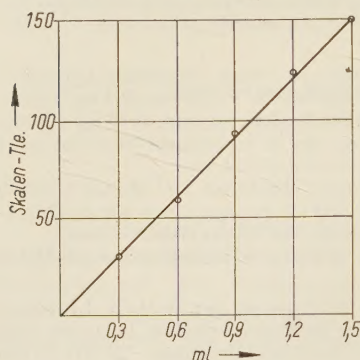


Abb. 1. Versuchsanordnung zur Lichtintensitätsmessung; *M* = Multiplier, *N* = Netzgerät, *V* = Röhrenmillivoltmeter, *R* = stufenweise veränderlicher Meßwiderstand.

⁷ M. J. Goodkind u. E. M. Harvey, J. cellular comparat. Physiol. **39**, 45 [1952], zit. in Biol. Abstr. **27**, 6935 [1953].

streuung an den Bakterien oder durch etwa vorhandene Eigenabsorption dieser Organismen vermindert wird. Um dies zu entscheiden, pipettierten wir 0,3, 0,6, 0,9, 1,2 und 1,5 ml Bakteriensuspension gleicher Dichte (60% Durchlässigkeit) in unseren Meßeinsatz ($\varnothing$ 1,1 cm). Der lineare



Verlauf der Kurve in Abb. 2 zeigt, daß den eben genannten möglichen Fehlerquellen in den bei den nachfolgenden Versuchen verwendeten Meßbereichen nicht Rechnung zu tragen ist.

Abb. 2

Kontrollversuch zur Lichtintensitätsmeßmethode. Abszisse: ml Bakteriensuspension pro Ansatz.

Ergebnisse

N-Quellen für *Photobacterium fischeri*

Es ist für Stoffwechseluntersuchungen von entscheidender Bedeutung, daß das C-Gerüst einer N-Quelle nicht gleichzeitig als Kohlenstoffquelle zu dienen vermag. So ersetzen wir Pepton⁸ — die N-Quelle des Standardmediums — bzw. Aminosäuren¹ sukzessiv durch äquimolekulare Mengen Harnstoffs oder der in Tab. 1 aufgeführten Ammoniumsalze^{9, 10}. Harnstoff als alleinige N-Quelle ergab sowohl gutes Wachstum wie auch eine ausgeprägte Lumineszenz.

Auf Grund von nephelometrischen Messungen sowie Messungen der emittierten Lichtmenge ergab sich, daß Ammoniumionen als alleinige N-Quelle genügen.

Als sehr geeignet erwiesen sich Ammoniumcarbonat, -sulfat und -chlorid. Die Lichtemission war bei Vanadatzugabe absolut und relativ am höchsten. Während

Tab. 1. Parallelmessungen von emittierter Lichtmenge und Wachstum bei *Photobacterium*-Kulturen unter Verwendung verschiedener Ammoniumsalze als N-Quelle.

Anion	Cl ^o	NO ₃ ^o	CO ₃ ^{2o}	CNS ^o	CrO ₄ ^{2o}	CH ₃ CO ₂ ^o
Licht (Skalen-Tle.) .	150	20	200	10	—	61
Trübung (%) . . .	35	31	32	29	—	25
Anion	C ₂ O ₄ ^{2o}	PO ₄ ^{3o}	SO ₄ ^{2o}	VO ₄ ^{3o}	MoO ₄ ^{2o}	WO ₄ ^{2o}
Licht (Skalen-Tle.) .	15	80	180	255	13	65
Trübung (%) . . .	26	27	27	5	3	15

⁸ A. Rippel-Baldes, Grundriß der Mikrobiologie, 3. Aufl., S. 46, Springer-Verlag, Heidelberg 1955.

⁹ A.-F. Kremmeter u. F. Bukatsch, Naturwissenschaften **47**, 500 [1960].

¹⁰ F. Bukatsch, S.-B. Akad. Wiss. Wien, math.-naturwiss. Kl. Abt. I, **145**, 259 [1936].

die Biolumineszenz durch Ammoniumrhodanid unbeeinflusst blieb, zeigte diese sonst als Wachstumshemmstoff bekannte Verbindung eine Wachstumsförderung, Chromat hemmte Wachstum und Leuchten völlig⁹.

Auf Grund der Ersetzbarkeit der Aminosäuren durch Ammoniumsalze als N-Quelle ist es nun möglich, in einem Kulturmedium zu experimentieren, welches den alleinigen Umsatz von C-Verbindungen zu untersuchen gestattet.

I. Der Umsatz von C-Verbindungen

Befunde zur Annahme des „by-pass“ in Leuchtbakterien

Das Vorhandensein des Krebscyclus als möglichen Abbauweg für Substrate konnten wir mit Hilfe von nephelometrischen und manometrischen Messungen sowie Lichtintensitätsmessungen nachweisen, indem wir Zwischenprodukte dieses Cyclus den Bakterien als Substrat boten.

Zugegebenes Malonat in 0,15*m* Phosphatpuffer, pH 6,5, wurde zwar nicht verwertet, hemmte aber die Veratmung von Succinat in keiner Weise (vgl. Abb. 3), was mit den Befunden von Bukatsch und Six¹ übereinstimmt.

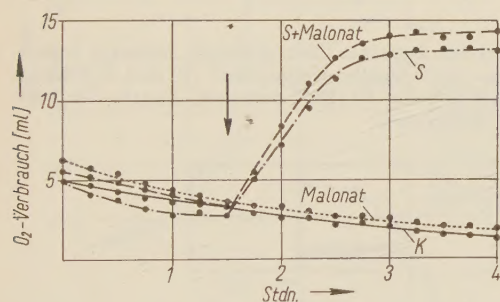


Abb. 3

Abb. 3. Atmungsmessung im Warburg-Apparat: Keine Hemmung der Succinat-Dehydrogenase durch Malonat. Zu dem durch Pfeil markierten Zeitpunkt wurden 0,2 ml 0,15*m* Lösungen der folgenden Substrate zugegeben: Succinat (S) bzw. Succinat + Malonat; Pufferlösung als Kontrolle (K).

Um so überraschender war die Beobachtung, daß wir bei Verwendung von Maleinsäure als C-Quelle statt des zu erwartenden Hemmeffekts¹¹ eine sechsfache Lichtintensität im Vergleich zu Fumarsäure feststellen konnten (Abb. 4).

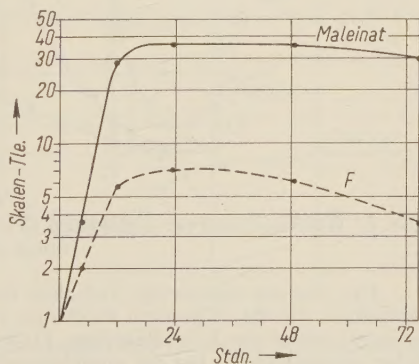


Abb. 4

Abb. 4. Lichtintensitätsmessung: Die emittierte Lichtmenge bei Maleinsäure als C-Quelle ist etwa 6mal so groß wie die bei Fumarsäure (F).

¹¹ W. O. James, Annu. Rev. Plant Physiol. 4, 73 [1953].

Bei der Testung der Maleinsäure in der Warburg-Apparatur wird nur sehr wenig Sauerstoff verbraucht, während die Veratmung von Fumarsäure unmittelbar einsetzt und die Atmungsintensität im Vergleich zu Äpfelsäure noch übertrifft (Abb. 5). Entsprechend der schwachen Atmungsintensität bei Maleinsäuregabe ergibt sich auch für das Wachstum eine sehr ausgedehnte Lagphase, was aus Abb. 6 hervorgeht. In dieser Abbildung zeigt die mittlere Kurve sowohl den Wachstumsverlauf bei Zugabe von Fumarsäure als auch den bei Zugabe eines Gemisches von Fumar- und Maleinsäure im Verhältnis 1 : 1.

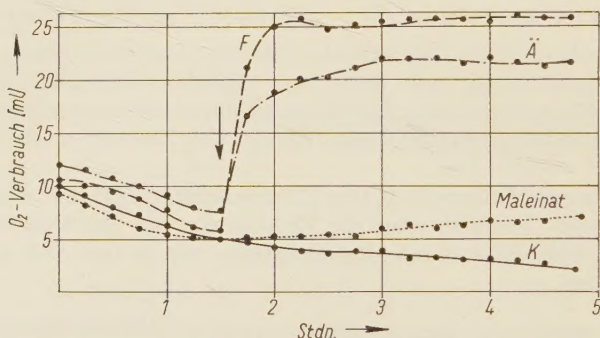


Abb. 5. Atmungsmessung im Warburg-Apparat: Nur geringer, langsam ansteigender O_2 -Verbrauch bei Maleinsäure als C-Quelle; Fumarsäure (F) und Äpfelsäure (Ä) werden unmittelbar verwertet; Kontrolle (K). Pfeil bedeutet: Zugabe der Testsubstanzen.

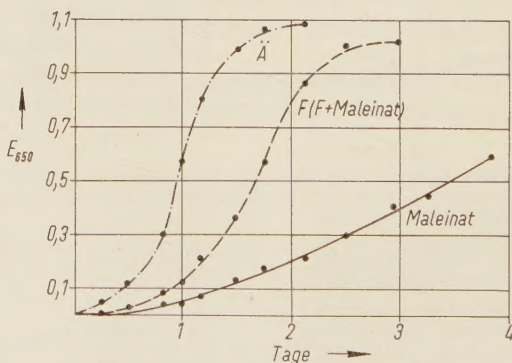


Abb. 6. Wachstumskurve: Äpfelsäure (Ä), Fumarsäure (F) bzw. Maleinsäure als Substrate.

Um nun das eigenartige Verhalten der Maleinsäure (vgl. Abb. 4) zu klären, versuchten wir die in unseren Bakterien eventuell vorkommende Maleinsäure zu isolieren, wozu wir 2,5 g Bakterien (Trockengewicht) 24 Std. im Soxhlet mit Äther extrahierten¹². Bei der anschließenden chromatographischen Trennung des

¹² K. Paech u. M. V. Tracey, Modern Methods of Plant Analysis, Bd. II, Springer-Verlag, Heidelberg 1956.

Extrakts in einem Cineolgemisch¹³ konnten wir keine Maleinsäure, wohl aber Fumarsäure nachweisen¹⁴.

Die in der Literatur angeführten Warburg-Versuche an *Pseudomonas* sp. mit Maleinsäure zeigen entweder eine partielle oder eine totale Inhibition, was Morgan und Friedmann¹⁵ auf SH-Funktionen (als Cofaktoren) in der Enzymreaktion zurückführen, da Thiolverbindungen mit Maleinsäure Additionsprodukte bilden. Bei Leuchtbakterien könnte eine derartige Additionsverbindung ein für die Lumineszenzreaktion geeignetes Substrat darstellen, womit sich die relativ hohen Lichtwerte bei Maleinsäuregabe (*cis*-Verbindung!) erklären ließen. Neben- oder Abbauprodukte dieser hypothetischen Reaktionen dienten dann als Substrat für den Energiestoffwechsel.

Schon das Fehlen einer Atmungshemmung durch Malonat (Abb. 3) zeigte, daß der Tricarbonsäurecyclus nur eine unzureichende Erklärung für die Endoxydation der Kohlenhydrate bei Leuchtbakterien bietet. Die Beobachtung, daß unser Testbakterium neben den genannten Substanzen auch Acetat als C-Quelle zu verwenden vermag (Abb. 7), berechtigt zu der Annahme, daß hier für den oxydativen Abbau der Kohlenhydrate noch andere Stoffwechselwege in Betracht zu ziehen sind. Würde nämlich Acetat als Acetyl-Coenzym A über die Oxalessigsäure

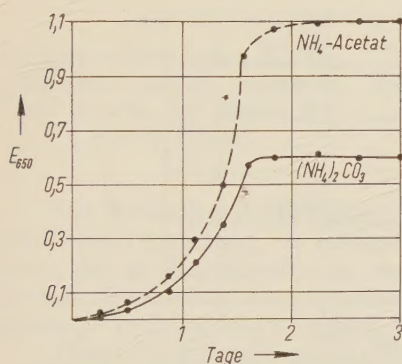
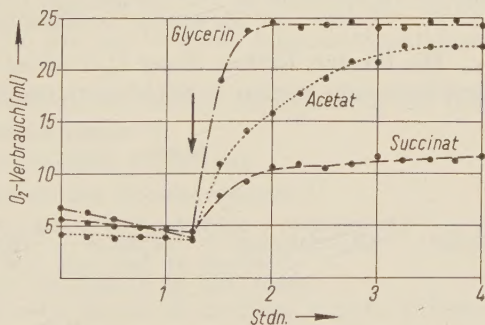


Abb. 7. Wachstumskurve: Beide Kulturen enthielten zu geringen Mengen an Glycerin als C-Quelle. Während die Kultur mit $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ ihr Wachstum nach Verbrauch des Glycerins einstellte, wuchs die Kultur mit $\text{NH}_4(\text{CH}_3\text{COO})$ gleichmäßig weiter.

Abb. 8. Atmungsmessung im Warburg-Apparat: Der O_2 -Verbrauch liegt bei Glycerin sowie bei Acetat als C-Quelle etwa in der gleichen Größe; zum Vergleich Succinat.



¹³ E. Lederer u. M. Lederer, Chromatography, 2. Aufl., S. 192, Elsevier Publ. Comp., New York 1957.

¹⁴ L. Lack, J. biol. Chemistry **236**, 2835 [1961].

¹⁵ E. J. Morgan u. E. Friedmann, Biochem. J. **32**, 733, 862 [1938].

in den Cyclus eingeschleust werden, dessen einmaliger Umlauf eine C_2 -Einheit in Form von $2 CO_2$ wieder eliminiert, so bedeutete dies wohl einen Gewinn an freier Energie, böte aber keine Erklärung für eine Nettosynthese des C_2 -Acceptors Oxalacetat, da Zwischenglieder des Cyclus ständig zu biosynthetischen Reaktionen verbraucht werden¹⁶.

Außer dem Wachstum untersuchten wir bei unserem *Photobacterium*-Stamm auch den O_2 -Verbrauch (Abb. 8) sowie die Lichtausbeute bei Acetat als C-Quelle. Hier ergab sich, daß die Meßwerte in der gleichen Größenordnung liegen wie bei der Verwendung von Glycerin, das bislang als geeignetste C-Quelle für Leuchtbakterien beschrieben wurde¹. Der langsame Anstieg der Acetatkurve in Abb. 8 stellt wohl eine Adaptationsphase an das Milieu dar, da die Bakterien zunächst auf Glycerin gezogen waren.

Neben Acetat boten wir den Bakterien folgende C_2 -Einheiten als alleinige C-Quelle: Äthanol, Glyoxylsäure, Glykol, Glycin und Oxalsäure. Alle hier angeführten Verbindungen wurden von den Bakterien mehr oder weniger rasch umgesetzt (vgl. z. B. Abb. 9 und 10).

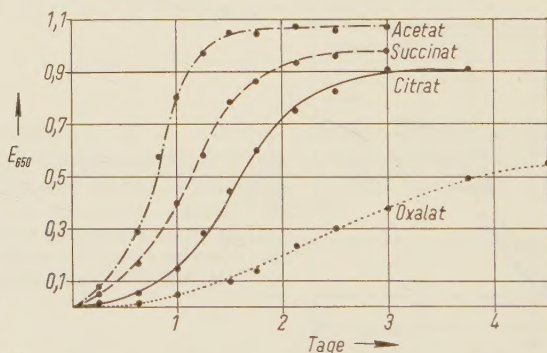
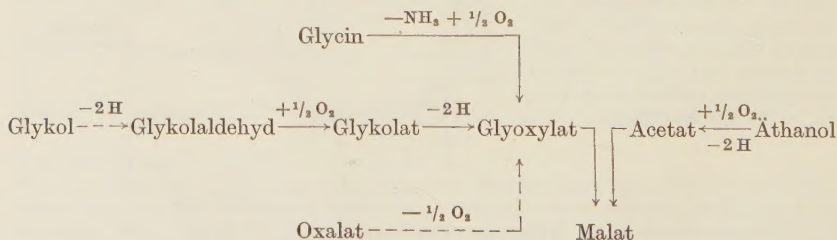


Abb. 9. Wachstumskurven mit verschiedenen C-Quellen. Die Substanzen wurden als 0,5proz. Lösungen geboten.

Die für den Einbau dieser C_2 -Verbindungen in Frage kommenden Reaktionswege werden in nachfolgendem Schema wiedergegeben:

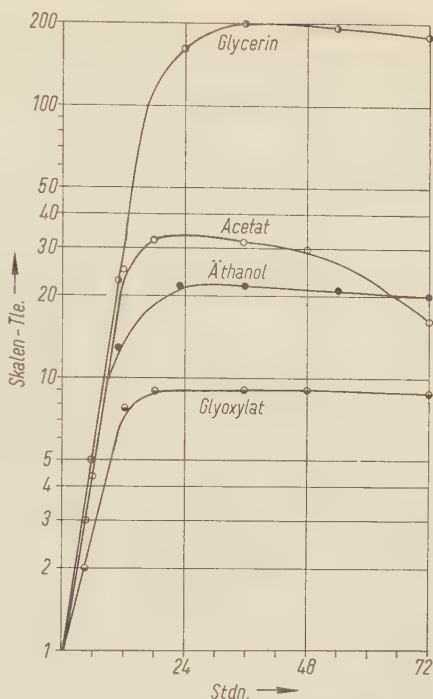


¹⁶ H. L. Kornberg, Proc. IVth. int. Congr. Biochemistry, Vienna 1958, Bd. XIII, S. 251, Pergamon Press, London 1959.

Ein Enzymsystem, das die Äthanoloxydation zu Acetat katalysiert, ist in *Escherichia coli* nachgewiesen¹⁷. Die Glycin-Glyoxylat-Reaktion wurde in einer Reihe tierischer und pflanzlicher Gewebe vorgefunden¹⁸. In Rattengewebe-homogenaten konnten die Reaktionen Glykolaldehyd $\rightarrow$ Glykolat $\rightarrow$ Glyoxylsäure gezeigt werden (l. c.¹⁹, u. zwar S. 772), der letzte Reaktionsschritt auch in *Neurospora*. Die unterbrochenen Linien deuten hypothetisch Enzymreaktionen an. Auf die Synthesereaktion Glyoxylat + Acetat $\rightarrow$ Malat wird später näher eingegangen.

Abb. 10

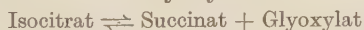
Lichtintensitätsmessung mit verschiedenen C-Quellen. Äthanol als 1proz. Lösung, die übrigen Substanzen 0,5proz.



Die Befunde mit Malonsäure sowie Maleinsäure einerseits, die C₂-Einheiten-Verwertung als einziger C-Quelle andererseits, führten uns dazu, das an *Pseudomonas sp.* entdeckte²⁰ und von Kornberg¹⁶ eingehend untersuchte Enzymsystem des „by-pass“ auch für *Photobacterium f.*⁹ in Erwägung zu ziehen.

Dieser Cyclus stellt neben der von Seaman²¹ entdeckten direkten Kondensation zweier Acetateinheiten die einzige Möglichkeit zur Netto-synthese von C₄-Dicarbonsäuren dar und ist durch folgende Reaktionen gekennzeichnet:

1. Isocitrat-Lyase katalysiert die reversible Aldolspaltung des Isocitrats zu Succinat und Glyoxylat¹⁸.



2. Malat-Synthase katalysiert das Acceptorsystem²².



¹⁷ H. L. Kornberg, Annu. Rev. Microbiol. **13**, 49 [1959].

¹⁸ H. J. Saz u. E. P. Hillary, Biochem. J. **62**, 563 [1956].

¹⁹ J. S. Fruton u. S. Simmonds, General Biochemistry, 2. Aufl., J. Wiley & Sons, Inc., London 1959.

²⁰ J. J. R. Campbell, R. A. Smith u. B. A. Eagles, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **11**, 594 [1953].

²¹ G. R. Seaman, J. biol. Chemistry **228**, 149 [1957].

²² K. Decker, Die aktivierte Essigsäure, Verlag Enke, Stuttgart 1959.

Das Gleichgewicht dieser Reaktion ist auf Grund der Hydrolyse der Acylmercaptanverbindung zugunsten der Spaltprodukte verschoben.

Nachweis der Glyoxylsäure

Nach Paech und Tracey¹² stellten wir einen Leuchtbakterienextrakt mit Äther (pH 5) her, nachdem Fette und Wachse durch Vorextraktion mit Petroläther entfernt waren. Die Lösung wurde anschließend auf 1,5 ml eingengt, hierauf im Überschuß gesätt. 2,4-Dinitro-phenylhydrazin-Lösung²³ zugesetzt. Der Extrakt wurde aufsteigend in Lösungsmittel I²⁴ (Butanol/Äthanol/Wasser 5:1:4) und Lösungsmittel II¹² (Butanol/konz. NH₃ 96:4) auf Schleicher & Schüll-Papier Nr. 4025 b gl chromatographiert. Bei der Präparation der als Vergleichssubstanzen benötigten Dinitrophenylhydrazone kristallisierten 2-Oxo-propionsäure und 2-Oxo-glutarsäure bei Raumtemperatur unmittelbar aus, das Glyoxylsäurederivat erst nach 10stdg. Stehenlassen bei 6–7°.

Statt der in der Literatur²³ erwähnten Entwicklung mit 10proz. Na₂CO₃-Lösung betrachteten wir die Chromatogramme unter einer UV-Lampe, unter welcher die Hydrazone als tiefblaue Flecken erschienen.

Die Erscheinung, daß im Chromatogramm u. U. für eine Substanz zwei Flecken auftreten, hat ihren Grund in der Bildung von stereoisomeren Hydrazonen, die in der Literatur für die synthet. Vergleichssubstanzen beschrieben werden. In manchen Lösungsmittelsystemen laufen jedoch die Isomeren zusammen was aber nicht immer mit den Literaturangaben übereinstimmt¹².

Tab. 2 beweist an Hand der R_F-Werte das Vorhandensein der Glyoxylsäure in den Bakterienauszügen; weiter zeigt diese Übersicht, daß die der Literatur entnommenen R_F-Werte ohne die Methode der Chromatographie keine sicheren Kennzeichen für eine Substanzidentität darstellen.

Tab. 2. R_F-Werte der gefundenen Oxosäuren (Literaturwerte^{23, 24} in Klammern).
I = Butanol/Äthanol/Wasser 5:1:4; II = Butanol/konz. NH₃ 96:4.

Lösungs- mittel	Glyoxylat	Pyruvat		2-Oxo-glutarat
I	0,32 (0,32)	0,40 (0,36)	0,59 —	0,19 (0,26)
II	0,25 (0,26)	0,33 (0,48)	0,60 (0,61)	0,05 (0,06)

Darstellung der Isocitrat-Lyase und Nachweis der Malat-Synthase bei *Photobacterium f.*

Zur Darstellung der Enzyme gingen wir von Acetontrockenpulver aus, das nach Strehler und Cormier²⁵ hergestellt worden war. Leuchtbakterien, die auf Glycerin gewachsen waren, wurden aus der Flüssigkeitskultur abzentrifugiert und mit Aceton getrocknet. 2 g des so erhaltenen hellgelben Pulvers brachten wir zusammen mit 30 g Glasperlen (Ø 0,17 mm) und 20 ml Wasser je 5mal 1 Min. in einen Homogenisator (B. Braun, Melsungen, Type 2876). Die Probe wurde in mehreren Abständen geschüttelt, um die trotz Kühlung mit fester Kohlensäure auftretenden Lokalerwärmungen im Inneren der Suspension möglichst auszuschließen.

²³ M. F. S. El Hawory u. R. H. S. Thompson, Biochem. J. **53**, 340 [1953].

²⁴ D. Cavallini, N. Frontali u. G. Toschi, Nature [London] **163**, 568 [1949].

²⁵ B. L. Strehler u. M. J. Cormier, Arch. Biochem. Biophysics **47**, 16 [1953].

Zum Absetzen der Glasperlen und Bakterienfragmente zentrifugierten wir die Probe 15 Min. bei 5000 U./Min. Waschwasser, das wir durch nochmaliges Zentrifugieren des Sediments erhielten, wurde dem Überstand beigegeben. Durch Klarzentrifugieren des Überstandes bei 25000 U./Min. (etwa 80 Min., $\approx 27000 \times g$, Christ-Zentrifuge, Universal KS III) erhielten wir das Cytolysat (Frakt. A).

Diese Fraktion wurde mit 0,1*n* HCl auf pH 4,8 gebracht, kurzzeitig bei 25000 U./Min. zentrifugiert, das sedimentierte Eiweiß in 0,2*m* Pyrophosphat (pH 7) aufgenommen und diese Lösung mit 0,1*n* NaOH auf pH 7 eingestellt (Isoelektrisches Präzipitat = Frakt. B). Eine Anreicherung der Isocitrat-Lyase erhielten wir durch fraktionierte $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung²⁶.

Alle Arbeitsgänge wurden unter N_2 -Atmosphäre ausgeführt, da — wie wir feststellten — in Gegenwart von O_2 die Fermentaktivität bedeutend rascher absinkt; deshalb gestattet dieses Verfahren auch eine höhere Geschwindigkeit des Magnetrührers.

Die Frage, ob die Enzymsysteme während der Aufarbeitung eine nennenswerte Schädigung erfahren, läßt sich im Falle der Leuchtbakterien auf relativ einfache Weise entscheiden. Man bringt zu der jeweiligen Probe eine Lösung von reduziertem Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid sowie eine Spur Flavinmononucleotid (letzteres nur beim isoelektrischen Präzipitat und den anschließenden $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällungen) und beobachtet in einem dunklen Raum, ob Licht emittiert wird oder nicht (Lumineszenzreaktion)².

Ein Kriterium für die Güte des Acetontrockenpulvers ist seine helle, gelbliche Farbe; die Lumineszenzkurve von befeuchtetem Trockenpulver zeigt nach einem kurzen steilen Anstieg ein exponentielles Absinken.

Die Bestimmung der Isocitrat-Lyase erfolgte spektralphotometrisch, und zwar im wesentlichen nach einer Methode von Dixon und Kornberg²⁷. Ihr Prinzip beruht auf der Messung der zunehmenden optischen Dichte bei 324 $m\mu$, abhängig von der Entstehung des Glyoxylsäure-phenylhydrazons, das sich aus Glyoxylsäure und Phenylhydrazin bildet.

Im Gegensatz zu der zitierten Methode ließen wir die Reaktion bei pH 7,4 ablaufen. In diesem Milieu ist die Aktivität des Enzyms 10—15mal so groß wie bei pH 6,85. Außerdem inkubierten wir statt 6 μMol Cystein nur 2 μMol , nachdem wir feststellen konnten, daß Cystein bei dieser Reaktion offenbar unabhängig von der vorhandenen Menge nur als Aktivator dient. Manchmal läßt eine geringere Cysteinmenge eine größere Fermentaktivität entstehen.

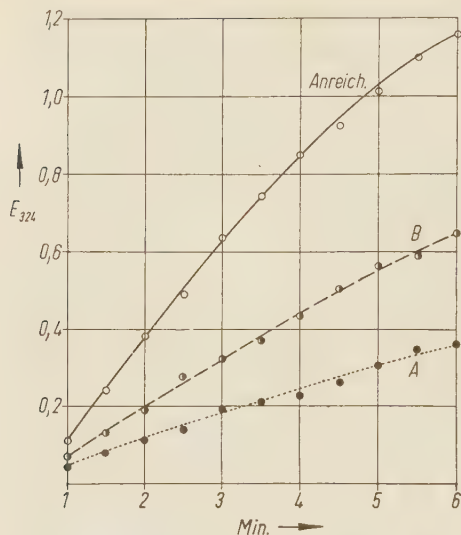
Unser Ansatz enthielt in 3 ml: 200 μMol K-Phosphatpuffer (pH 7,4), 15 μMol MgCl_2 , 10 μMol Phenylhydrazin-hydrochlorid, 2 μMol Cystein-hydrochlorid, 0,05—0,2 ml Extrakt und Wasser. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 μMol DL-Isocitrat gestartet. Nach einer Lagphase von 30—60 Sek. ist die Extinktionszunahme bei 324 $m\mu$ etwa 4 Min. linear.

Abb. 11 zeigt den Verlauf der Isocitrat-Lyase-Reaktion im Cytolysat, im isoelektrischen Präzipitat und in einer Anreicherungsfraktion.

Die Malat-Synthase testeten wir nach einem ebenfalls bei Dixon und Kornberg²⁷ angegebenen Verfahren. Diese Methode beruht auf der Messung der abnehmenden optischen Dichte bei 232 $m\mu$, was auf eine Spaltung der Thioester-Bindung des Acetyl-Coenzyms A in Gegenwart von Glyoxylat zurückgeht.

²⁶ A.-F. Kremmeter, H. J. Schliep u. F. Bukatsch, Z. Naturforsch. **16b**, 678 [1961].

²⁷ G. H. Dixon u. H. L. Kornberg, Biochem. J. **72**, 3 [1959].



Nachdem wir die Reaktion 5 Min. beobachtet hatten und hierbei keine Veränderung eingetreten war — was im Falle eines Acetyl-CoA-Deacylase-Systems²⁸ möglich gewesen wäre — starteten wir mit Glyoxylat. Hierbei konnten wir in Übereinstimmung mit Dixon zwar einen raschen Abfall der optischen Dichte beobachten, jedoch war die Extinktionsdifferenz zu gering für einen eindeutigen Nachweis.

Abb. 11

Verlauf der Isocitrat-Lyase-Reaktion bei Frakt. A, Frakt. B und einer Anreicherungsfraktion.

Um jedoch einen eindeutigen Beweis für das Vorhandensein der Malatsynthese in unseren Leuchtbakterien zu erbringen, inkubierten wir den 5fachen Ansatz nach einer bei Kornberg¹⁶ angegebenen Bestimmungsmethode in der Warburg-Apparatur 1 Stde. bei 30°. Das hierbei entstandene Malat isolierten wir chromatographisch in Äthanol/NH₃/Wasser 90:5:5¹². Der Malat-Nachweis erfolgte mittels Fluoreszenzlöschung durch 4-Methyl-umbelliferon (0,2proz. alkohol. Lösung, mit verdünntem NH₃ auf pH 8 eingestellt).

II. Ersetzbarkeit der L-Aminosäuren durch die entsprechenden D-Isomeren

Verwertbarkeit von D-Aminosäuren

Ersetzt man L-Aminosäuren, die als N-Quelle dienen, durch L-Aminosäuren-Strukturanaloga, so treten kompetitive Hemmungen auf²⁹, Effekte, die durch Zugabe der entsprechenden D-Isomeren nicht ausgelöst werden können³⁰. Trotz der häufig zu beobachtenden antibiotischen Effekte bei Bakterienkulturen nach D-Aminosäureninkubation³¹ sind einige Bakterienstämme^{32, 33} gefunden worden, welche die „unnatürlichen“ D-Isomeren zu verwerten vermögen. Doch in den Brennpunkt des Interesses trat das D-Aminosäure-Problem erst, als es gelungen war, D-Isomere aus Bakterienmembranen zu isolieren³¹.

²⁸ J. Gergely, P. Hele u. C. V. Ramakrishnan, J. biol. Chemistry **198**, 323 [1955].

²⁹ H. O. Halvorson u. S. Spiegelman, J. Bacteriol. **64**, 207 [1952].

³⁰ B. Magasanik, Annu. Rev. Microbiol. **11**, 221 [1957].

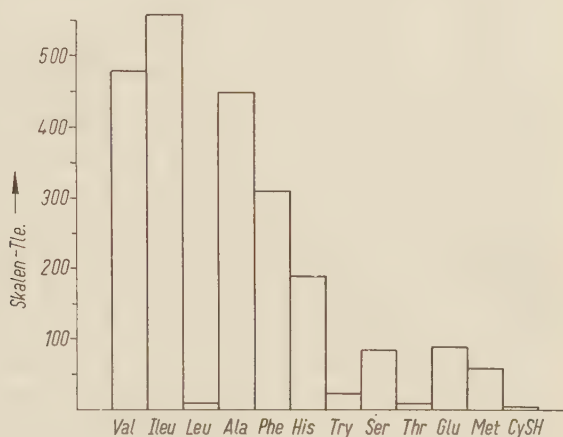
³¹ A. Jenney, Hungarica Acta Physiol. **1**, 142 [1948], zit. in Biol. Abstr. **22**, 21395 [1948].

³² M. N. Camien, J. biol. Chemistry **197**, 687 [1952], zit. in Biol. Abstr. **27**, 1472 [1953].

³³ M. Ikawa, Arch. Biochem. Biophysics **78**, 338 [1958].

Neben der auxanographischen Methode — womit ein Großteil der erwähnten Experimente durchgeführt wurde — hatten wir bei unserem Organismus die Möglichkeit, mit Hilfe der weit empfindlicheren Lichtintensitätsmessung die Wirkungsweise der D-Aminosäuren zu untersuchen. Hierzu boten wir unseren Bakterien 12 verschiedene D-Aminosäuren als N-Quelle. Während alle Kulturen ein relativ kräftiges Wachstum zeigten, waren die Lumineszenzeffekte von Aminosäure zu Aminosäure verschieden (Abb. 12); jedoch beobachteten wir im Vergleich zu den Racematen, die uns nur im Falle des Valins, Isoleucins, Alanins, Serins und Methionins zur Verfügung standen, bedeutend höhere Lichtintensitäten.

Abb. 12
Lichtintensitätsmessung
bei Gabe verschiedener
D-Aminosäuren.



Die unterschiedliche Lichtemission bei Zugabe der verschiedenen Aminosäuren dürfte außer von Permeabilitätsfaktoren insbesondere von der Frage abhängen, inwieweit die einzelnen Verbindungen sich auf enzymatischem Wege zu Substanzen um- oder abbauen lassen, deren Energiepotential die Zelle auszunutzen vermag, d. h. zu Stoffen, die dem Intermediär-, nicht dem Sekundärstoffwechsel dienen³⁴.

Die emittierten Lichtmengen waren bei Gabe von D-Valin bzw. D-Isoleucin am größten; das C-Gerüst beider Verbindungen wird über den Fettsäurecyclus oxydiert, dessen Produkte über ein hohes Energiepotential verfügen. Demgegenüber erwies sich die nicht glucogene Aminosäure Leucin — über deren Abbauweg nur wenig bekannt ist — im photometrischen Test als sehr schwach wirksam.

Aus Hefe konnte ein beim Leucinabbau gebildetes Isoamylamin isoliert werden³⁵, welches möglicherweise einen hemmenden Effekt auslöst. Die geringe Lichtausbeute nach Zugabe von Tryptophan macht das Vorhandensein der aus *E. coli* isolierten Tryptophanase unwahrscheinlich, die u. a. zur Bildung von Pyruvat führt.

³⁴ H. Reznik, *Ergebn. Biol.* **23**, 14 [1960].

³⁵ M. Stephenson, *Bacterial Metabolism*, 3. Aufl., Longmans, Green & Co., London 1949, zit. n. l. c.¹⁹, S. 787.

Fehlen von D-Aminosäuren im Protein

Die im Vergleich zu L-Isomeren kräftige Anregung von Wachstum und Leuchten durch D-Isomere veranlaßte uns, Zellwand- und Cytoplasmaprotein getrennt auf das Vorhandensein von D-Aminosäuren zu untersuchen.

Die chromatographische Trennung der Eiweißhydrolysate (110°, 24 Stdn., in 6*n* HCl) in α -Picolin/Wasser/NH₃ 70:28:2 bzw. Propanol-(2)/Eisessig/Wasser 7:1:2 auf Whatman Nr. 1 ergibt das übliche bei Kandler und Zehender³⁶ zitierte Aminosäuren-Schema von Bakterienprotein. Die Aminosäurezusammensetzung ist qualitativ wie auch quantitativ (Vergleich an Hand der Fleckengröße und Farbintensität) unabhängig von der N-Quelle des Nährmediums (N-Quelle: 1. Harnstoff, 2. D-Alanin, 3. 12 verschiedene D-Aminosäuren).

Um die bei 110° eventuell eintretende Racemisierung der Aminosäuren auszuschließen, wurde das Eiweiß auch bei 40° 15 Tage hydrolysiert³⁷. Bei diesem Verfahren konnten wir das bei Kandler in Frage gestellte Vorkommen der γ -Aminobuttersäure eindeutig nachweisen, und zwar in gleicher Intensität bei der Chromatographie unmittelbar nach der Hydrolyse wie auch nach zweimonatigem Aufbewahren des Hydrolysats bei -15°. Wie bei Kandler zeigte sich ein „Stoff A“ in unmittelbarer Nähe der Glutaminsäure, welcher sich aber von dieser nicht trennen ließ. Außerdem erhielten wir bei diesem schonenden Proteinabbau nach Ninhydrinfärbung einen stark gelben Fleck mit einem R_F -Wert von 0,07–0,08 in Butanol/Eisessig/Wasser 4:1:1 bzw. einem R_F -Wert von 0,89 in Methanol, der einer nicht identifizierten Substanz angehört.

Ein aus Nierenextrakt selbst hergestelltes, in Rinderserumalbumin stabilisiertes und vom Coenzym abgespaltenes Präparat der D-Aminosäure-Oxydase³⁸ zeigte nach Zugabe von Flavin-Adenin-Dinucleotid einen O₂-Verbrauch von 29,7 μ l pro 10 Min., wobei DL-Alanin als Substrat diente³⁹. Das bei der Bausteinanalyse des Gramicidins von Synge³⁷ verwendete Präparat hatte einen O₂-Umsatz von 34 μ l pro 10 Min.

Die Chromatogramme wurden sowohl in getrocknetem^{40, 41} wie auch in feuchtem³⁷ Zustand mit einer Lösung von D-Aminosäure-Oxydase in *n*/15 Pyrophosphatpuffer von pH 8,3 besprüht. Die feuchten Bogen ließen wir 3½ Stdn. bei 37° in einer O₂-Atmosphäre hängen. Hierauf wurden die Chromatogramme getrocknet und mit Ninhydrin entwickelt, wobei keine Intensitätsverringerung der violetten Flecken stattfand. Lediglich der erwähnte, stark gelbe Fleck mit R_F 0,07–0,08 bzw. 0,89 war nicht mehr zu sehen.

³⁶ O. Kandler u. C. Zehender, Arch. Mikrobiol. **24**, 41 [1956].

³⁷ R. L. M. Synge, Biochem. J. **44**, 542 [1949].

³⁸ E. Negelein u. H. Brömel, Biochem. Z. **300**, 225 [1939].

³⁹ G. Pfeleiderer in H. M. Rauen, Biochem. Taschenbuch, S. 972, u. zwar S. 992, Springer-Verlag, Heidelberg 1955.

⁴⁰ F. Cramer, Papierchromatographie, 4. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim 1958.

⁴¹ H. F. Linskens, Papierchromatographie in der Botanik, Springer-Verlag, Heidelberg 1955.

Die ebenfalls 15 Tage in 6*n* HCl bei 40° behandelten Test-D-Aminosäuren zeigten nach gleicher Behandlung, daß bei diesem relativ schonenden Verfahren keine Racemisierung eingetreten war.

Da eventuell noch in Spuren vorhandenes Butanol, das als Laufmittel verwendet wurde, die Wirksamkeit des Enzyms hätte schädigen können, inkubierten wir das Proteinhydrolysat mit dem Enzympräparat in der Warburg-Apparatur bei 37°³⁹, wobei wir keinen O₂-Umsatz feststellen konnten; damit ist ein weiterer Hinweis auf das Fehlen der D-Formen gegeben.

Da das Enzym jedoch einerseits nur D-Aminosäuren mit primärer und sekundärer Aminogruppe oxydiert (s. l. c.³⁹, S. 980), andererseits aber mit Dicarbonsäuren kaum reagiert⁴², kann das Vorhandensein gewisser D-Aminosäuren nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Ferner konnten wir bei der Inkubation von *Photobacterium*-Enzymextrakten zusammen mit gesätt. Flavin-Adenin-Dinucleotid-Lösung in Pyrophosphatpuffer keinen O₂-Umsatz beobachten, wobei wir DL-Alanin als Substrat boten, eine Feststellung, die das Fehlen einer D-Aminosäure-Oxydase nahelegt.

Unser Bakterienstamm ist gram-negativ bis gram-intermediär, was mit den Beobachtungen von Johnson übereinstimmt⁶. Bekanntlich wurden in den Zellwänden gram-negativer Organismen bisher nur L-Aminosäuren nachgewiesen, was unsere Befunde hinsichtlich des Fehlens der D-Aminosäuren im Protein unterstützt. Nach Vendrely⁴³, der überhaupt die Gramfärbung als keine spezifische Reaktion auf eine bestimmte Substanz interpretiert, stellt der Übergang gram-negativ bis gram-intermediär einen bestimmten physikalisch-chemischen Zustand der Bakterienmembran dar.

Das Permeaseproblem

Der Vorgang des Stoffaustausches zwischen der Zelle und ihrer Umgebung ist teils passiver Natur (Diffusion, Osmose), teils handelt es sich dabei um aktive Prozesse⁴⁴. So konnten in den vergangenen Jahren bei Bakterien stereospezifische Permeationssysteme, sogenannte Permeasen, nachgewiesen werden, die von den Enzymen des Stoffwechsels verschieden sind⁴⁵.

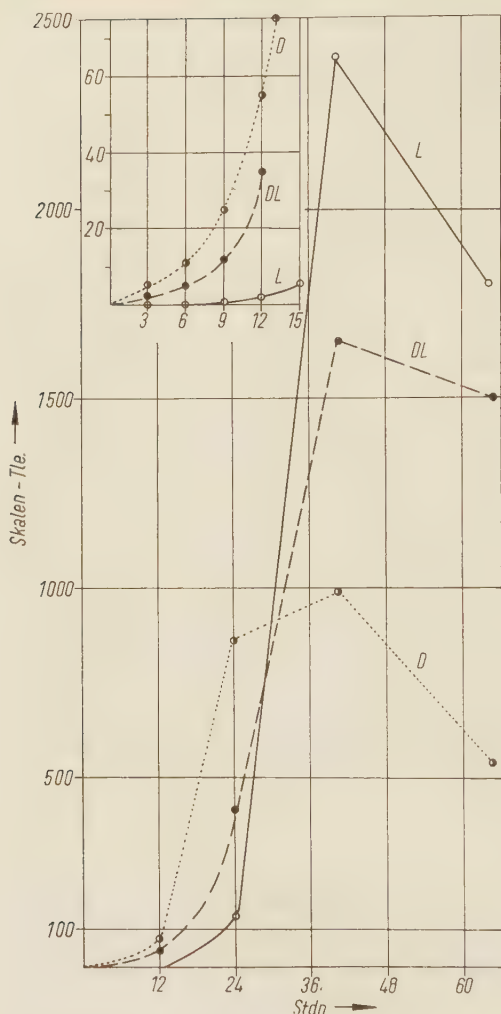
Neben der auxanographischen Methode bediente man sich beim Nachweis dieser Systeme hauptsächlich der Tracer-Methode³⁰. Da uns keine markierten Substanzen zur Verfügung standen, verwendeten wir die Lichtintensitätsmessung als indirektes Verfahren; denn die emittierte Lichtmenge ist nach Johnson⁶ innerhalb bestimmter Grenzen proportional der Substratoxydation, was auch durch die gleichzeitige Atmungs- und Lumineszenzhemmung bei Zugabe von Naphthochinon

⁴² P. Boulanger u. R. Osteux in H.-U. Bergmeyer, Methoden d. enzymat. Analyse, S. 367, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße 1962.

⁴³ R. Vendrely, Int. Rev. Cytol. 4, 115 [1955].

⁴⁴ F. C. Steward, Plant Physiology, Bd. II, Academic Press, New York 1959.

⁴⁵ G. N. Cohen u. J. Monod, Bacteriol. Rev. 21, 169 [1957].



bestätigt wurde⁴⁶. Die Substratoxydation ihrerseits ist abhängig von der Menge des in die Zelle eingedrungenen Stoffes.

Inwieweit Aminosäuren über derartige Permeationssysteme in die Zelle gelangen, konnte für L-Aminosäuren gezeigt werden⁴⁵; da aber die D-Isomeren bei vielen Bakterien das Plasmalemma nicht zu durchdringen vermögen, gelten D-Aminosäuren für die Permeation der L-Isomeren im allgemeinen weder als Inhibitoren noch als Antagonisten^{45, 47}.

Abb. 13. Lichtintensitätsmessung bei Gabe äquimolekularer Mengen an D-, DL- und L-Alanin in Abhängigkeit von der Zeit nach der Beimpfung. Bei den Werten über 24 Stdn. wurden die Meßpunkte durch Gerade verbunden.

Zur Untersuchung dieser Frage boten wir unseren, auf Harnstoff als N-Quelle gezogenen Bakterien äquimolare Mengen an D-, DL- und L-Alanin (250 mg/l). Bei der D- bzw. DL-Kultur war schon nach 3 Stdn. eine Lumineszenz meßbar, während dies bei der L-Kultur etwa 10 Stdn. dauerte (Abb. 13). Die emittierte Lichtmenge der DL-Kultur betrug von der 3. bis 24. Stde. etwa die Hälfte derjenigen der D-Kultur; 27 Stdn. nach Beimpfung waren die Lichtintensitäten beider Kulturen gleich, wäh-

⁴⁶ W. D. McElroy u. D. M. Kipnis, J. cellular comparat. Physiol. **30**, 359 [1947], zit. in Biol. Abstr. **22**, 14170 [1948].

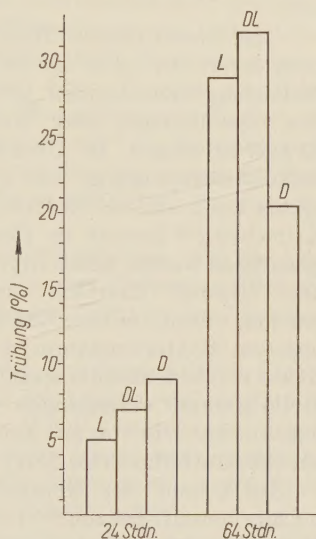
⁴⁷ K. G. Lark, Canad. J. Microbiol. **5**, 381 [1959].

rend nach 40 Stdn. die emittierte Lichtmenge der DL-Kultur der halben Lichtmenge der L-Kultur plus der halben Lichtmenge der D-Kultur entsprach, eine Relation, die angenähert auch für die Messung nach 64 Stdn. gilt. Die L-Kultur hingegen, die anfänglich nach ihrer Lagphase nur eine geringe Lichtmenge emittierte, sandte nach 40 Stdn. die 1,5fache Lichtmenge der DL-Kultur bzw. die 2,5fache Lichtmenge der D-Kultur aus.

Bei Inkubation mit nur einer Aminosäure weist der Cytoplasmprotein-Aufbau gegenüber dem der Zellwand eine Verzögerung auf³⁰. Doch für die Vermehrung der Zellen ist primär die Cytoplasmprotein-Synthese von Bedeutung, d. h. je größer die Proteinsynthese, desto größer ist die Vermehrungsrate der Bakterien, desto größer auch die Enzymbildung. In der Tat stellten wir zum gleichen Zeitpunkt, als bei der L-Kultur die erste Lichtemission zu beobachten war (vgl. Abb. 13), auch nephelometrisch eine Zuwachsrates der Bakterien fest. Das Bakterienwachstum verläuft anfänglich also parallel zur Enzymbildung. In späteren Stadien allerdings ist das Bakterienwachstum relativ stärker als die emittierte Lichtmenge (vgl. Abb. 14).

Abb. 14

Wachstum bei Gabe äquimolarer Mengen an D-, DL- und L-Alanin.



Ein Vergleich zwischen D- und DL-Kulturen zeigt, daß die Durchlaßgeschwindigkeit für D-Alanin dem Konzentrationsgradienten direkt proportional ist. Je mehr oxydierbare Substanz der Zelle zur Verfügung steht, desto mehr Licht wird emittiert⁶ (Abb. 13). Die dem Konzentrationsgradienten direkt proportionale Durchlaßgeschwindigkeit eines Stoffes ist nach Steward⁴⁴ ein eindeutiges Kriterium für einen Diffusionsvorgang, d. h. D-Alanin gelangt wohl durch Diffusion in die Zelle.

Demgegenüber erfüllt die Permeation des L-Alanins eindeutig die Kriterien der Permeasebildung:

- a) Vorhandensein eines Induktors (L-Alanin)
- b) Abhängigkeit von der Proteinsynthese
- c) Stereospezifität

Die Verweilphase für L-Alanin entspricht so der Induktionsphase des Enzymproteins (Abb. 13).

Ähnliche Relationen wie zwischen D- und DL-Alanin konnten wir auch im Falle des Valins und Isoleucins nachweisen, jedoch standen uns die entsprechenden L-Isomeren wie auch bei den übrigen Aminosäuren nicht zur Verfügung; wir können deshalb keine Aussagen über die Enzymspezifität machen.

Überimpften wir eine auf L-Alanin gezogene Kultur kurzzeitig in ein Medium mit Harnstoff als N-Quelle und inkubierten wir diese Stämme wieder in eine Kulturflüssigkeit mit L-Alanin, so erhielten wir abermals die in Abb. 13 dargestellten Verhältnisse. Dieser Befund zeigt eindeutig, daß die „L-Alanin-Permease“ bei Leuchtbakterien nicht ein konstitutives, sondern ein induziertes Enzym darstellt⁴⁸.

Diskussion

Auf Grund unserer Befunde scheint zwar der Maleinsäure und wohl auch deren Derivaten im Stoffwechsel der Leuchtbakterien eine gewisse Bedeutung zuzukommen, jedoch können wir für den bei Bukatsch und Six¹ diskutierten, über Maleinat verlaufenden Reaktionsweg keinen Beweis erbringen. In Übereinstimmung mit diesen Autoren fehlt die Malonsäurehemmung, was uns veranlaßte, neben dem Tricarbonsäurecyclus auch andere Stoffwechselwege bei *Photobacterium f.* zu prüfen. Kornberg¹⁶ konnte in *Pseudomonas*-Stämmen, die nicht auf Acetat gewachsen waren, keine Glyoxylsäure nachweisen, ferner verhielten sich nach Olson⁴⁹ Extrakte von *Acetobacter suboxydans*, die auf Glycerin gezogen waren, im Isocitrat-Lyase-Test inaktiv. Wir konnten jedoch aus unserem Bakterienstamm, der nicht auf Acetat gezogen war, Isocitrat-Lyase von bedeutender spezifischer Aktivität erhalten, worauf an anderer Stelle genauer eingegangen wird²⁶. Die Isocitrat-Lyase ist also — wenigstens bei dem von uns untersuchten Bakterium — nicht ausschließlich ein substratinduziertes Enzym.

Auf Grund der Hemmbarkeit der Isocitrat-Lyase durch Kupfer, *p*-Chlormercuri-benzoat⁴⁹ u. a. erweist sich das genannte Enzym zwar als Sulfhydryl-Ferment, seine Aktivierung durch Cystein läßt sich aber nicht als eine Regeneration von durch O₂ oxydierten SH-Gruppen des Enzyms erklären. Diese Annahme hätte einen ständigen Verbrauch an Cystein zur Folge, was wir nicht feststellen konnten.

Wenn Cystein bei dieser Reaktion nur als SH-Donator diene, würde sie wohl in gleicher Weise auch mit Glutathion ablaufen, was aber nicht der Fall ist. Da diese Mercaptoverbindung ein schwächeres Reduktionsmittel darstellt als Cystein⁵⁰, dürfte letzteres auf Grund seiner Redoxlage als spezifischer Elektronenüberträger bei dieser Reaktion betrachtet werden.

Die Bedeutung des Glyoxylsäurecyclus besteht in der Bereitstellung von geeigneten C-Gerüsten für biosynthetische Reaktionen¹⁶. Inwieweit allerdings dieser Cyclus für die Lumineszenzreaktion der Leuchtbakterien

⁴⁸ J. Mandelstam, Int. Rev. Cytol. **5**, 51 [1956].

⁴⁹ J. A. Olson, J. biol. Chemistry **234**, 5 [1959].

⁵⁰ Th. Wieland, Angew. Chem. **66**, 34 [1954].

in Betracht zu ziehen ist, läßt sich nicht entscheiden; jedoch sind weitere Untersuchungen geplant. Da die emittierte Lichtmenge bei Acetat wie bei Glycerin als C-Quelle Meßwerte der gleichen Größenordnung ergibt, ist mit einer wesentlichen Beteiligung des „by-pass“ am Leuchtvorgang zu rechnen.

Was das Permeaseproblem anbelangt, so war es unter den gegebenen Umständen nicht möglich, die von Novelli⁵¹ bei *E. coli* beschriebenen Hemmungen der Aminosäureaktivierung bei der Proteinsynthese (z. B. „PP-ATP-exchange“) durch D-Aminosäuren für *Photobacterium f.* zu untersuchen, was insofern von Interesse gewesen wäre, als sich gerade bei diesem Bakterium im Gegensatz zu vielen bislang untersuchten Bakterien alle untersuchten D-Isomeren als stoffwechselaktiv erwiesen.

Während wir für den von Halvorson⁵² beschriebenen Induktionsvorgang „precursor $\rightleftharpoons$ enzyme“ aus den vorliegenden Versuchen keine Anhaltspunkte finden, wird die „deaptation“ eines Enzyms als „dilution of preformed enzyme“⁵³ auf Grund des Überimpfungsversuches anschaulich. Dieser läßt sich auch nach Rickenberg⁵⁴ als Komplex von Enzym und enzymbildendem System („enzyme-forming system“) interpretieren, welcher in Abwesenheit des Induktors der Grund für eine „repression“ der Enzymbildung ist.

Die Tatsache, daß Wachstum von Leuchtbakterien und die von ihnen emittierte Lichtmenge — abgesehen von den Anfangsstadien der Entwicklung einer Kultur — nicht koordinieren, wird in der Literatur vielfach beschrieben⁵⁵.

Worin aber der Grund dafür zu suchen ist, daß die emittierte Lichtmenge der Kultur mit L-Alanin schließlich 2,5mal stärker ist als die der D-Kultur, kann nicht angegeben werden. Wohl könnte man daran denken, daß der Umbau von D- zu L-Isomeren einen energieverbrauchenden Prozeß darstellt, wiewohl die direkte Racemisierung mit Pyridoxalphosphat als Cofaktor keine endergone Reaktion ist⁵⁶.

Dem Direktor des Botanischen Instituts, Prof. Dr. L. Brauner, sowie dem Direktor des Instituts für Strahlenbiologie an der Universität München, Herrn Prof. Dr. O. Hug, sagen wir für die Anteilnahme am Fortschritt der Arbeit und die Bereitstellung von Geräten besten Dank. Am letztgenannten Institut erfreuten wir uns auch der bereitwilligen Unterstützung von Herrn Dr. H. J. Schliep, dem wir dafür sehr verbunden sind.

Zusammenfassung

1. Harnstoff oder Ammoniumsalze sind für die N-Ernährung des Leuchtbakteriums *Photobacterium fischeri* allein ausreichend.

⁵¹ G. D. Novelli, Annu. Rev. Microbiol. **14**, 65 [1960].

⁵² H. O. Halvorson, Advances in Enzymol. **22**, 99 [1960].

⁵³ H. V. Rickenberg, C. Yanofsky u. D. M. Bonner, J. Bacteriol. **66**, 683 [1953].

⁵⁴ H. V. Rickenberg, Nature [London] **185**, 240 [1960].

⁵⁵ A. H. Farghaly, J. cellular comparat. Physiol. **36**, 165 [1950], zit. in Biol. Abstr. **25**, 13042 [1951].

⁵⁶ W. A. Wood, Methods in Enzymol. **2**, 215 [1955].

2. Das Enzymsystem des „glyoxylate by-pass“ wurde durch direkte Enzymmessungen sowie durch Isolierung der Reaktionsprodukte nachgewiesen.
3. Isocitrat-Lyase ist bei *Photobacterium f.* kein ausschließlich substratinduziertes Enzym.
4. Die Aktivierung der Isocitrat-Lyase-Reaktion durch Cystein wird als spezifische Elektronenübertragung gedeutet.
5. D-Aminosäuren werden aufgenommen, verwertet und verursachen anfänglich bedeutend höhere Lichtintensitäten als die „natürlichen“ L-Isomeren.
6. Die chromatographische Trennung der Bestandteile von Zellwand- und Cytoplasmaprotein ergibt die übliche Aminosäurezusammensetzung. Das Vorhandensein der γ -Aminobuttersäure in den Proteinen von *Photobacterium f.* konnte gesichert werden. Das Protein enthält keine D-Aminosäuren.
7. Während D-Alanin auf dem Wege der Diffusion in die Zelle gelangt, ist für die Aufnahme von L-Alanin eine induzierte „L-Alanin-Permease“ anzunehmen.

Summary

1. Urea or ammonium salts satisfy the nitrogen requirements of *Photobacterium fischeri*.
2. The glyoxylate by-pass was demonstrated by direct enzyme measurements and by isolation of intermediates.
3. Isocitrate lyase is not a substrate-induced enzyme in *Photobacterium f.*
4. Activation of the isocitrate lyase reaction by cysteine is interpreted as a specific electron transfer.
5. D-amino acids are taken up and utilised by the organism, and initiate a significantly higher light intensity than the „natural“ L-isomers.
6. Chromatographic analysis of the cell wall and cytoplasmic proteins showed the normal amino acid composition. The presence of γ -aminobutyric acid in the proteins of *Photobacterium f.* was confirmed. The protein contained no D-amino acids.
7. D-alanine diffuses into the cell, while the entry of L-alanine appears to be under the control of a specific, induced „permease“.

Dr. Anton-Franz Kremmeter, Institut für Strahlenschutzforschung, Zweigniederlassung der Gesellschaft für Kernforschung m. b. H., 8042 Neuherberg b. München, Post Schleißheim, Ingolstädter Landstr. 1.